

siRNA 型オリゴヌクレオチドの LCMS™-8060 による定量分析と分子量確認

はじめに

核酸医薬品は、標的 RNA やタンパク質に特異的に結合するようにデザインされた合成オリゴヌクレオチドです。これまでに承認されている核酸医薬品の多くはアンチセンス型ですが、その他にもアプタマー型と siRNA 型が承認されています。核酸医薬品の多くは 20 塩基程度であり、分子量は 6000 程度になります。原薬の分子量確認には MALDI-TOF 型や Q-TOF 型の LC/MS などの精密質量分析が用いられます。一方、薬物の血中動態解析などの定量分析では、高感度でダイナミックレンジの広いトリプル四重極型質量分析計が汎用されています。

ここでは、siRNA 型核酸医薬品の原薬分析を想定し、合成二本鎖オリゴヌクレオチドのトリプル四重極型質量分析計 LCMS-8060 による分析例を紹介します。SIM (Selected ion monitoring) による定量性の確認を行いました。SIM モードによる検量線作成では、1 fmol~10 pmol の範囲で直線性を確認できました。加えて、多価イオン質量スペクトルのデコンボリューションにより分子量を確認しました。

M. Yamada

サンプル

配列：サンプル：double strand oligonucleotide (21nt) :
AS-RNA, 5'-pU CGA AGU AUU CCG CGU ACG dTdT-3'
Mw : 6646.0 (Average mass)
SS-RNA, 5'-pC GUA CGC GGA AUA CUU CGA dTdT-3'
Mw : 6669.0 (Average mass)

分析条件

HPLC と MS の分析条件を表 1 に示します。

表 1 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™)	
Column	: 市販 C18 column (100 mm×2.1 mm I.D., 1.7 μm)
Mobile phases	: A) 200 mM HFIP*1 and 7.5 mM TEA*2/water B) Methanol
Gradient Program	: B conc. 4 % (0 min) – 20 % (8.0 min)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Column Temp.	: 75 °C
Injection volume	: 10 μL
[MS conditions] (LCMS-8060)	
Ionization	: ESI (Negative mode)
Probe Voltage	: -3 kV
Mode	: Q3 scan (m/z 500 - 1800) SIM m/z 1666.0 (SS), m/z 1659.9 (AS)
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 5.0 L/min
Heating gas flow	: 15.0 L/min
DL Temp.	: 250 °C
Heat Block Temp.	: 500 °C
Interface Temp.	: 350 °C

*1 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
*2 Triethylamine

SIM クロマトグラム

SS-Oligo と AS-Oligo 各 100 fmol の混合溶液の SIM クロマトグラムを図 1 に示しました。イオンペアクロマトグラフィーにより、それぞれ 6.88 分と 6.94 分に溶出し、分離度 R は 0.3 でした。

図 2 には、両成分の質量スペクトルを示しました。AS-Oligo、SS-Oligo とともに、4 価~9 価のイオンが検出されました。SIM クロマトグラムでは、4 価のイオンを選択しました。

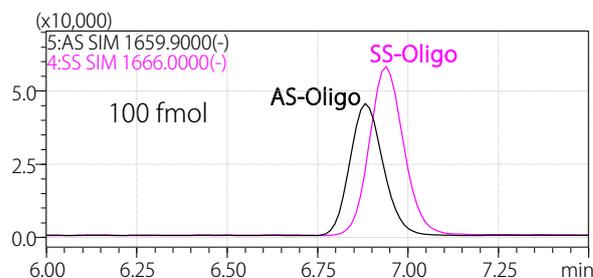


図 1 SIM クロマトグラム

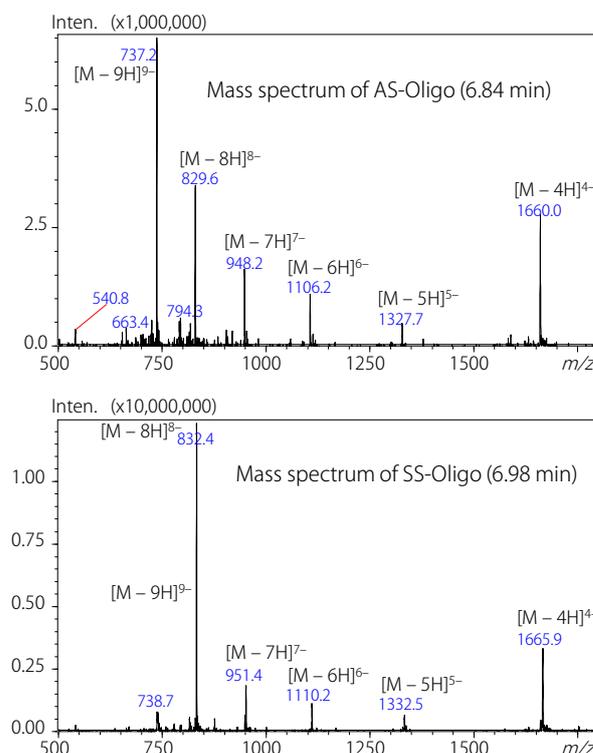


図 2 合成オリゴヌクレオチドのマススペクトル

■ 検量線

AS-Oligo と SS-Oligo についての検量線を、1 fmol~10000 fmol の範囲で取得しました。注入量 1 fmol (検出限界) と 5 fmol (定量下限) における SIM クロマトグラムを図 3 に示しました。検量線を図 4 に示しました。寄与率 (R²) は AS-Oligo が 0.997、SS-Oligo が 0.995 でした。MRM (Multiple reaction monitoring) による分析を試みましたが、定量下限は SIM を上回る結果が得られませんでした。MRM において、検量点 5 fmol は非検出でした。図 5 には参考として 50 fmol 注入時の MRM クロマトグラムを示しました。

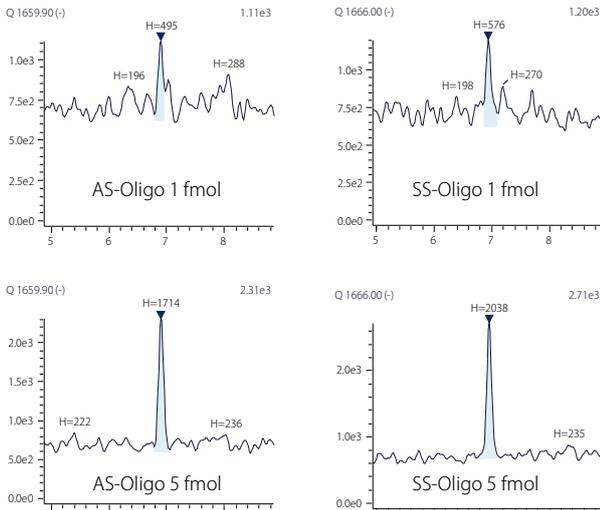


図 3 合成オリゴヌクレオチドの SIM クロマトグラム (H はピーク高さ)

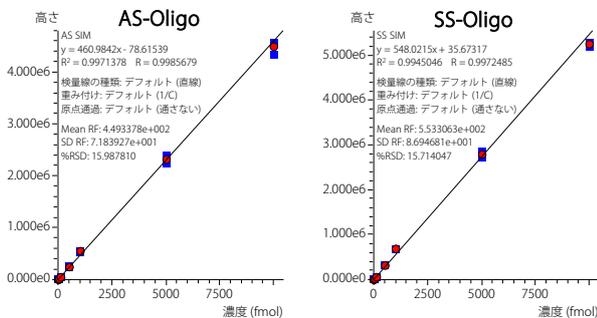


図 4 SIM クロマトグラムから取得した検量線

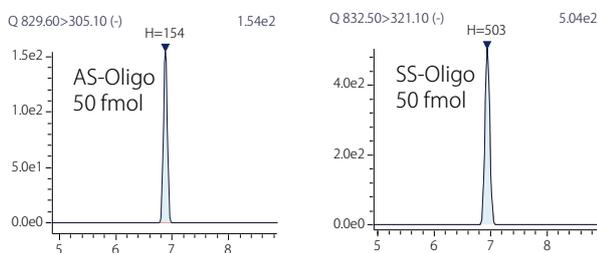


図 5 合成オリゴヌクレオチドの MRM クロマトグラム (H はピーク高さ)

■ デコンボリューション

ソフトウェア LabSolutions™ のデコンボリューション機能により分子量計算を行いました (図 6)。デコンボリューションスペクトルに示されるように、AS-Oligo と SS-Oligo の推定分子量は 6645.0 と 6667.2 であり、平均分子量との誤差は 1.0 Da と 1.8 Da でした。



図 6 デコンボリューションスペクトル (a) AS-Oligo、(b) SS-Oligo

■ まとめ

LCMS-8060 を用いた siRNA 型オリゴヌクレオチドの SIM による定量分析例を紹介しました。1 fmol~10 pmol の範囲で検量線が取得できました。定量下限は 5 fmol であり、10 μL 注入時の濃度では、約 3 ng/mL でした。

今回用いたオリゴヌクレオチドでは、MRM よりも SIM の方が、より低濃度側まで検量線が作成できました。MRM では 8 価のイオンをプリカーサーとした際に、最も強度の強いプロダクトイオンを得ました (データ非掲載)。しかし、MRM では、定量下限は SIM に及びませんでした。プロダクトイオンの絶対的な感度不足が原因と考えています。

四重極型質量分析計で得られる質量スペクトルは低分解能ですが、デコンボリューション機能により数 Da の誤差範囲内で分子量が確認できました。

LCMS、Nexera、および LabSolutions は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年6月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。